

公開特許・実用（抄録 A）

特開平 9-201581

【名称】有機化合物の分解方法、有機化合物の分解装置、微生物の単離方法および新規微生物

審査／評価者請求 未 請求項／発明の数 8 （公報 22頁、抄録 9頁）

公開日 平成 9年(1997) 8月 5日

出願／権利者 株式会社東芝（神奈川県川崎市幸区堀川町 7 2 番地）
 発明／考案者 池田 理夫 （他 3名）※
 出願番号 特願平8-309719 平成 8年(1996)11月20日
 優先権主張番号 特願平7-301200 1995年11月20日 日本（J P）
 代理人 須山 佐一

Int. Cl. 6 識別記号
 B09C 1/10 ZAB
 C02F 3/34
 C12N 1/20
 //(C12N 1/20
 C12R 1:01)
 FI
 B09B 3/00 ZAB
 C02F 3/34
 C12N 1/20
 ※最終頁に続く

【発明の属する技術分野】本発明は、有機化合物分解能を有する微生物を用いた有機化合物の分解方法、有機化合物分解能を有する微生物を用いた有機化合物の分解装置、有機化合物分解能を有する微生物の単離方法および有機化合物分解能を有する新規微生物に関する。

(57) 【要約】

【課題】 微生物を用いて環境汚染物質を分解・無害化するために、該汚染物質の分解に寄与する酵素等の産生を誘導する誘導物質等の新たな物質の添加を必要とせず、効率よく環境汚染物質を分解する微生物を単離する方法、該微生物を単離する方法により分離された微生物および該微生物を用いて環境を浄化する方法および装置を提供すること。

【解決手段】 本発明の微生物の単離方法は、有機化合物に汚染された環境より採取した試料等に由来する微生物を、炭素源を含まない培地で生育させながら、主に気相で有機化合物と接触させ、有機化合物耐性を指標として抽出（分離）する。また、本発明の有機化合物の分解方法および装置は、こうして得られた微生物、例えば、本発明による新規微生物であるコマガテラ・ブレビスを汚染土壌や汚染地下水と接触させることによって、添加物や誘導物質等の新たな物質を添加することなく、環境中の有機化合物を効率的に生物分解する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 第 1 の有機化合物に汚染された環境または前記環境と接触した試料に由来し有機化合物分解能を有する微生物と前記第 1 または第 2 の有機化合物とを接触する工程と、

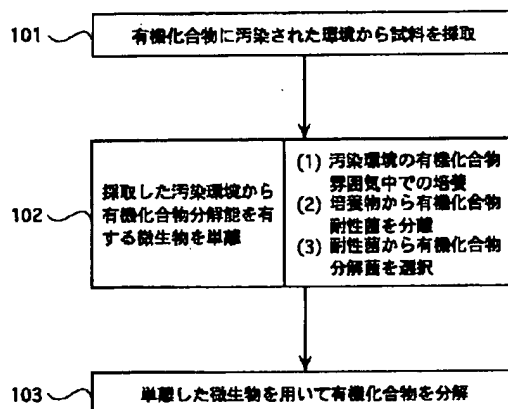
前記微生物により前記第 1 または前記第 2 の有機化合物を分解する工程とを具備したことを特徴とする有機化合物の分解方法。

【請求項 2】 第 1 の有機化合物に汚染された環境または前記環境と接触した試料から微生物を採取する工程と、

前記採取した微生物を有機化合物耐性が指標となるように培養する工程と、

前記培養した微生物を分離する工程と、

前記分離された微生物を有機化合物分解能を指標として選択する工程と、



前記選択された微生物と前記第 1 または第 2 の有機化合物とを接触する工程と、 前記微生物により前記第 1 または前記第 2 の有機化合物を分解する工程とを具備したことを特徴とする有機化合物の分解方法。

【請求項 3】 第 1 の有機化合物に汚染された環境または前記環境と接触した試料から微生物を採取する工程と、

前記第 1 の有機化合物の存在条件下で前記採取した微生物を培養する工程と、

前記培養した微生物を分離する工程と、

前記分離された微生物を有機化合物分解能を指標として選択する工程と、

前記選択された微生物と第 1 または第 2 の有機化合物とを接触する工程と、

前記微生物により前記第 1 または前記第 2 の有機化合物を分解する工程とを具備したことを特徴とする有機化合物の分解方法。

【請求項 4】 第 1 の有機化合物に汚染された環境または前記環境と接触した試料に由来し有機化合物分解能を有する微生物を保持する保持手段と、

前記保持手段に保持された微生物と前記第1または第2の有機化合物とを接触させる接触手段とを具備したことを特徴とする有機化合物の分解装置。

【請求項5】 有機化合物に汚染された環境または前記環境と接触した試料から微生物を採取する工程と、

前記採取した微生物を有機化合物耐性が指標となるように培養する工程と、

前記培養した微生物を分離する工程と、

前記分離された微生物を有機化合物分解能を指標として選択する工程とを具備したことを特徴とする微生物の単離方法。

【請求項6】 有機化合物に汚染された環境または前記環境と接触した試料から微生物を採取する工程と、

前記有機化合物の存在条件下で前記採取した微生物を培養する工程と、

前記培養した微生物を分離する工程と、

前記分離された微生物を有機化合物分解能を指標として選択する工程とを具備したことを特徴とする微生物の単離方法。

【請求項7】 有機化合物耐性を有し、かつ有機化合物分解能を有するコマガテラ・ブレビス (*Komagatella brevis*) である新規微生物。

【請求項8】 コマガテラ属、アルスロバクター属、プレバクテリウム属、クラビバクター属、ミコバクテリウム属、テラバクター属またはレニバクテリウム属に属し、有機化合物耐性を有し、かつ有機化合物分解能を有する新規微生物。

【発明の実施の形態】 以下、本発明を実施するための形態について説明する。

本発明の有機化合物の分解方法は、有機化合物に汚染された環境、あるいはこの汚染環境と接触した試料由来の有機化合物分解能を有する微生物を用いることを基本としている。以下に、本発明の有機化合物の分解方法の一実施形態について、図1を参照して述べる。

まず、有機化合物に汚染された環境から試料（汚染環境）を採取する（図1-101）。ここで、試料採取を行う汚染環境としては、有機化合物に汚染された環境であれば特に限定されるものではなく、例えば汚染土壌、汚染地下水、汚染河川水、汚染湖沼水等が挙げられる。汚染対象となる有機化合物についてもTCE、cis-DCE、trans-DCE、1,1-DCE等、特に限定されるものではない。

次に、採取した汚染環境またはこの汚染環境と接触した試料から、有機化合物分解能を有する微生物を単離する（図1-102）。このように、採取した汚染環境中で成育する微生物の中から、有機化合物分解能を有する微生物を単離することによって、有機化合物に対して耐性を有するとともに、有機化合物を炭素源として成育可能な微生物を効率よく得ることができる。すなわち、有機化合物耐性を有し、かつ有機化合物分解能を有する微生物が効率よく得られる。このような微生物によれば、後述する有機化合物の生物分解工程において、添加物や誘導物質等を用いることなく、安定した有機化合物分解能が簡便に得られるため、有機化合物の安定かつ効率的な分解性能を容易に維持することができる。

有機化合物分解能を有する微生物は、上記した単離工程（後に詳述する）で得られるものであればよく、具体的な微生物として特に限定されるものではないが、例えばミクロコッカス属、ストマトコッカス属、プラノコッカス属、スタフィロコッカス属、アクチノミセス属、

アミコラータ属、アルスロバクター属、プレバクテリウム属、クラビバクター属、コリネバクテリウム属、ゴールドナ属、コマガテラ属、ミコバクテリウム属、ノカルディア属、ピメロバクター属、レニバクテリウム属、ロドコッカス属およびテラバクター属に属する細菌等が挙げられる。表1および表2に、上記した各属の細菌の代表種（Type Strain）を示す。これら細菌に関しては、特開平7-96289号公報にミクロコッカス属あるいはスタフィロコッカス属の細菌を利用することが記載されているが、これらの属の細菌のうち全ての種が必ずしも実際の汚染環境下で良好な有機化合物分解能を有するわけではないことが明らかとなった。

ここで、実際に浄化が必要な環境とは、一般に、第1にpHが4~10、第1の条件に加えさらに第2に温度が277~313K、第1および第2の条件に加えさらに第3に有機化合物濃度が30ppb~500ppmの広い範囲にわたっている。これらの環境で生存、増殖し分解能を長時間維持し、より短時間で有機化合物を分解できなければ、汚染土壌や地下水中に放置、接触、散布、容器に入れての埋設、担体に固定した後には散布等して使用するタイプの有機化合物を分解する微生物として利用することはできない。

本発明者らは、本発明の微生物の単離方法における培養工程および有機化合物耐性を有する微生物の選択工程を経て抽出した有機化合物耐性の微生物のうち、特に細菌について、上記汚染環境条件下での有機化合物分解活性（具体的にはTCE分解能）を評価した。その結果、第1と第2の条件において利用できるのは、表1および表2に併記した有機化合物分解能が△、○、◎の種であった。第3の条件まで満足させるためには、○、◎で示した種でなければならない。◎で示した種は、より短時間（5日間以内に90%以上分解）で有機化合物を分解することができることから最も好ましい。これらの細菌は何らかの酸化酵素（例えばメタンモノオキシゲナーゼ、トルエンモノオキシゲナーゼ、アンモニア酸化酵素等）を体内に有し、あるいは体外へ放出し、これらの酵素が有機化合物の分解に関わっているものと考えられる。

【実施例】 次に、本発明の具体的な実施例について説明する。

（実施例1） まず、バイアルビンに前述した無機塩培地25mLとYMC T-001株のLB培地培養液100μL（OD 660=1.0）分の菌体とを入れ、これを複数用意した。別々のバイアルビンに、TCE、cis-DCE、trans-DCEをそれぞれ1ppmの濃度になるように加えた。これらを298K、100rpmで振盪培養しつつ、ガスクロマトグラフィを用いて各有機化合物の濃度の経時変化を測定した。それらの結果を図4に示す。

図4から明らかなように、いずれの有機化合物も10日以内に検出されなくなった。なお、これら以外にも、四塩化炭素、ジクロロエタン、トリクロロエタン、テトラクロロエタン、塩化ビニル、テトラクロロエチレン、ジクロロベンゼン、ポリ塩化ビフェニル（PCB）類に対しても分解活性を示した。

（実施例2） まず、バイアルビンに無機塩培地25mLと共に、YMC T-001株のLB培養液100μL（OD 660=1.0）分の菌体を入れたもの（サンプルA）、サンプルAと比較して25倍の菌数となるように遠心濃縮した菌液100μL分の菌体を入れたもの（サンプルB）、サンプルAと比較して100倍の菌数となるように遠心濃縮した菌液100μL分の菌体を入れたもの（サンプルC）

、およびサンプル A に用いた培養液を 1/4 稀釈した菌液 100 μ L 分の菌体を入れたもの (サンプル D) をそれぞれ用意した。

上述した各サンプルに TCE をそれぞれ 1ppm の濃度になるように加え、298K、100rpm で振盪培養しつつ、TCE 濃度の経時変化をそれぞれ測定した。それらの結果を図 5 に示す。図 5 から明らかなように、TCE の分解を開始する時点において、TCE と接触する菌数を増やすことによって、TCE の完全分解に至る時間を大幅に短縮できることが分かる。

(実施例 3) TCE 濃度を 1ppm、2ppm、3ppm、cis-DCE 濃度を 1ppm、5ppm、8ppm、trans-DCE 濃度を 1ppm、2ppm と変化させると共に、25 倍濃縮菌液 100 μ L 分の菌体を加える以外は、実施例 2 と同様にして分解試験を行った。それらの結果を図 6、図 7 および図 8 にそれぞれ示す。これらの図から明らかなように、YMCT-001 株は高濃度の有機化合物の分解能力を有することが分かる。

(実施例 4) まず、バイアルビンに無機塩培地 25mL と共に、YMCT-001 株の LB 培養液 100 μ L (OD 660=1.0) 分の菌体を入れ、グルコースを全有機炭素 (TOC) として、0.18mg/L (サンプル E)、18mg/L (サンプル F)、1800mg/L (サンプル G)、10000mg/L (サンプル H) および無添加 (対照区; サンプル I) となるように調整した各サンプルをそれぞれ用意した。

上述した各サンプルに TCE をそれぞれ 1ppm の濃度になるように加え、298K、100rpm で振盪培養しつつ、TCE 濃度の経時変化をそれぞれ測定した。それらの結果を図 9 に示す。

図 9 から明らかなように、YMCT-001 株は、TCE およびグルコースが共存していたとしても、本実施例におけるグルコース濃度の範囲で TCE 分解活性を示した。また、図 9 から明らかなように、YMCT-001 株は、グルコースが 0.18mg/L ~ 1800mg/L の範囲では、グルコースが共存しない場合と同等、あるいはそれ以上の TCE 分解活性を示した。なお、TCE 以外にも、四塩化炭素、ジクロロエタン、トリクロロエタン、テトラクロロエタン、塩化ビニル、テトラクロロエチレン、ジクロロベンゼンおよびポリ塩化ビフェニル (PCB) 類に対してほぼ同様の分解活性を示した。

(実施例 5) まず、バイアルビンに、約 100ppm の cis-DCE に汚染された体積 25mL の褐色森林土 (cis-DCE 100mg/kg 土壌) と無機塩培地 10mL と YMCT-001 株の LB 培養液 100 μ L (OD 660=1.0) 分の菌体とを加え (cis-DCE 液中濃度約 4ppm)、それ以外は実施例 2 と同様にして分解試験を行った。その結果、土壌に含まれていた cis-DCE は 7 日後に検出されなくなった。

(実施例 6) まず、バイアルビンに約 2ppm の cis-DCE と約 1ppm の TCE に汚染された地下水 25mL と YMCT-001 株の LB 培養液 100 μ L (OD 660=1.0) 分の菌体とを加え、それ以外は実施例 2 と同様にして分解試験を行った。その結果、cis-DCE および TCE 共に 14 日以内に検出されなくなった。

(実施例 7) YMCT-001 株を各種の担体に保持して固定化し、10ppm の TCE の分解試験を行った。担体としては、以下の表 3 に示すものをそれぞれ用いた。図 10 に固定化菌による分解試験結果の一例 (担体: アルギン酸カルシウムゲル) を示す。図 10 から明らかなように、遊離状態の細菌と比較して、多量の細菌を分

解対象物と接触させることができる固定化菌体を用いることによって、より高濃度の有機化合物を短時間で分解することができた。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の有機化合物の生物分解法の一工程例を、本発明の有機化合物分解用微生物の製造工程例と共に示す図である。

【図 2】 図 1 に示す有機化合物分解用微生物の製造工程例の分解菌選択工程における分解試験結果の一例を示す図である。

【図 3】 近隣結合法 (NJ 法: neighbor-joining method) により得られた分子系統樹を示す図である。

【図 4】 実施例 1 における YMCT-001 株を用いた各種有機化合物の分解試験結果を示す図である。

【図 5】 実施例 2 における YMCT-001 株の菌数と TCE 分解率との関係を示す図である。

【図 6】 実施例 3 における TCE 濃度を変化させた場合の YMCT-001 株による TCE の分解率を示す図である。

【図 7】 実施例 3 における cis-DCE 濃度を変化させた場合の YMCT-001 株による cis-DCE の分解率を示す図である。

【図 8】 実施例 3 における trans-DCE 濃度を変化させた場合の YMCT-001 株による trans-DCE の分解率を示す図である。

【図 9】 実施例 4 におけるグルコース存在下での YMCT-001 株による TCE 分解試験結果を示す図である。

【図 10】 実施例 7 における固定化菌および遊離菌を用いた場合の TCE 分解試験結果を比較して示す図である。

【図 11】 実施例 8 における有機化合物の分解を実施した状況を示す図である。

【図 12】 実施例 8 における YMCT-001 株を用いた各種有機化合物の分解試験結果を示す図である。

【図 13】 実施例 9 における有機化合物の分解を実施した状況を示す図である。

【図 14】 実施例 9 における YMCT-001 株を用いた各種有機化合物の分解試験結果を示す図である。

【図 15】 実施例 10 における有機化合物の分解を実施した状況を示す図である。

【図 16】 実施例 10 における YMCT-001 株を用いた各種有機化合物の分解試験結果を示す図である。

【図 17】 実施例 11 における有機化合物の分解を実施した状況を示す図である。

【図 18】 実施例 11 における YMCT-001 株を用いた各種有機化合物の分解試験結果を示す図である。

【図 19】 実施例 12 における有機化合物の分解を実施した状況を示す図である。

【図 20】 実施例 12 における YMCT-001 株を用いた各種有機化合物の分解試験結果を示す図である。

【図 21】 実施例 13 における有機化合物の分解を実施した状況を示す図である。

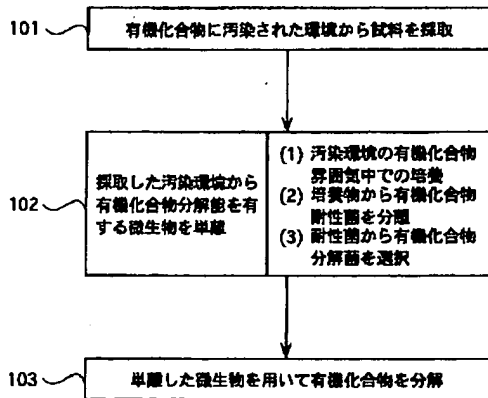
【図 22】 実施例 13 における YMCT-001 株を用いた各種有機化合物の分解試験結果を示す図であ

る。

【符号の説明】

- 101 ……汚染環境採取工程
 102 ……有機化合物分解能を有する微生物の抽出工程
 102(1) ……有機化合物中での培養工程
 102(2) ……耐性菌の単離工程
 102(1) ……分解菌の選択工程
 103 ……有機化合物の生物分解工程
 111 ……テフロン製濾紙 112 ……不飽和帯
 113 ……透水層
 114 ……難透水層 115 ……飽和帯
 116 ……バイオリアクタシステム 117 ……タンク
 118 ……給水管 119 ……排出管 120 ……バイオフィルタ
 121 ……挿入管 122 ……ブロー 123 ……供給管
 124 ……土壌 125 ……排出管
 126 ……揚水循環システム 127 ……微生物供給装置
 128 ……供給管 129 ……ポンプ 130 ……給水管
 131 ……活性炭吸着塔 132 ……供給装置
 133 ……筒状体
 134 ……浄化システム 135 ……微生物供給装置

【図1】

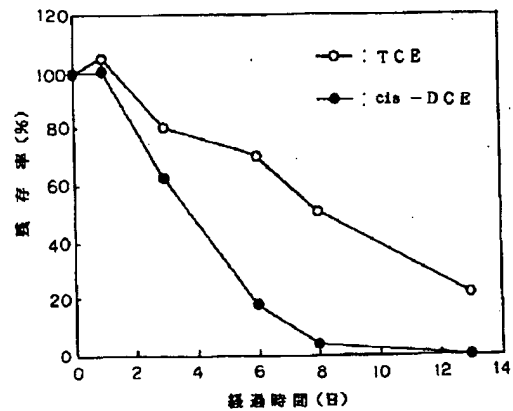


装置

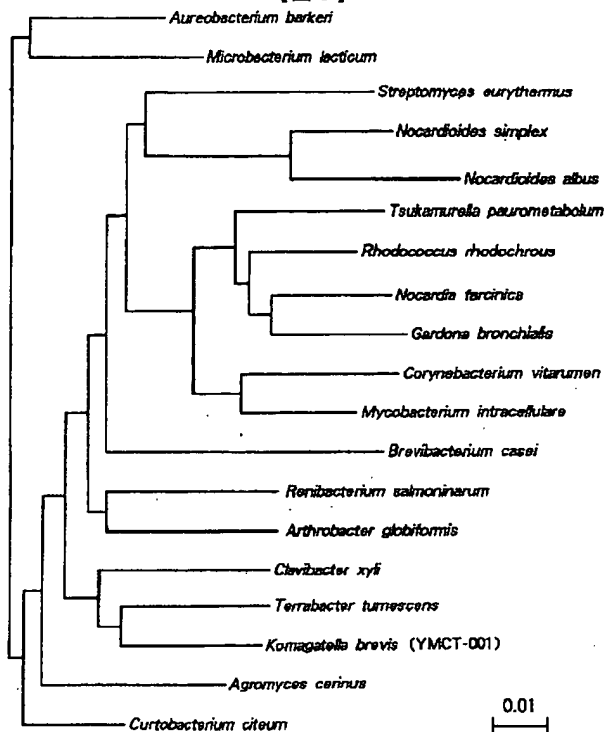
- 136 ……供給管 137 ……挿入管 138 ……供給装置

【図2】

【分解菌選択工程例】

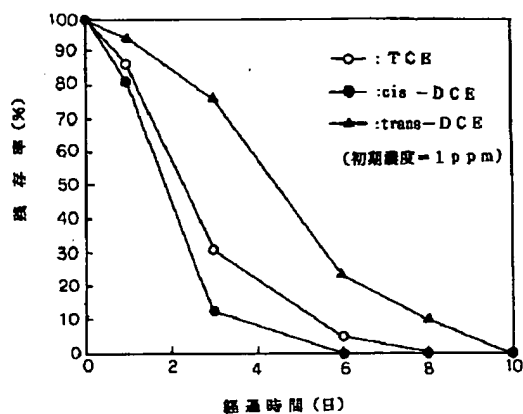


【図3】



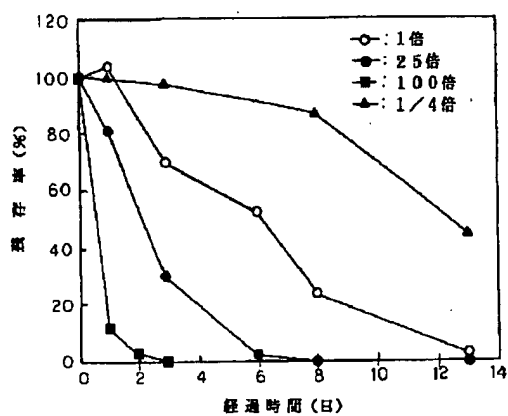
【図4】

【実施例1】

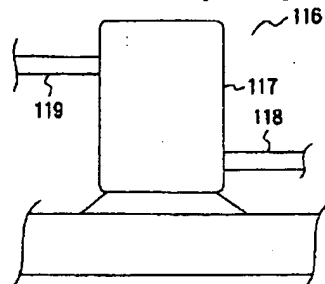


【図5】

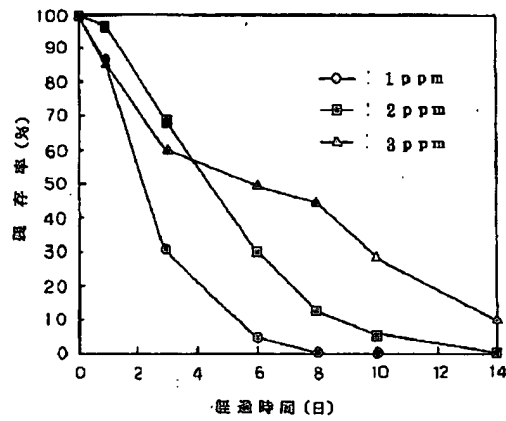
【実施例2】



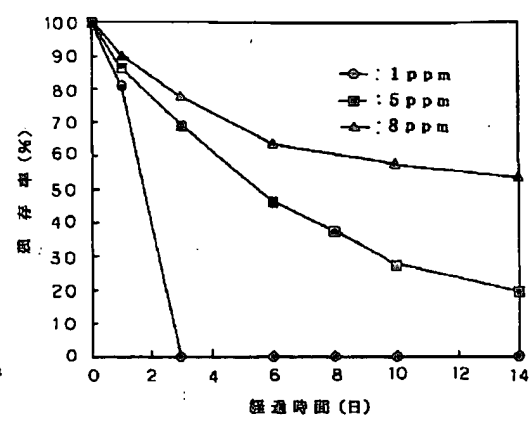
【図13】



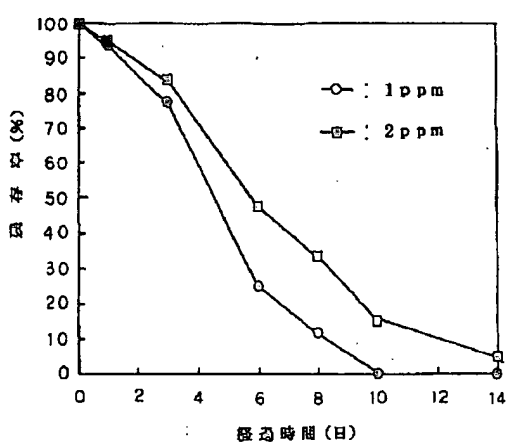
【図6】
【実施例3-1 (TCE)】



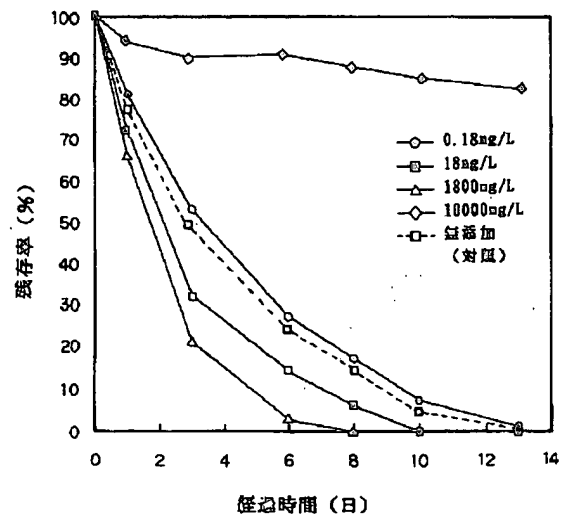
【図7】
【実施例3-2 (c-DCE)】



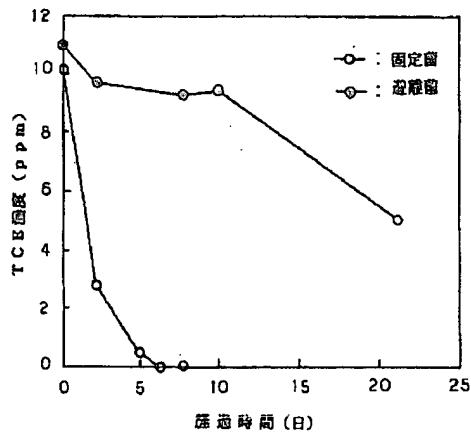
【図8】
【実施例3-3 (t-DCE)】



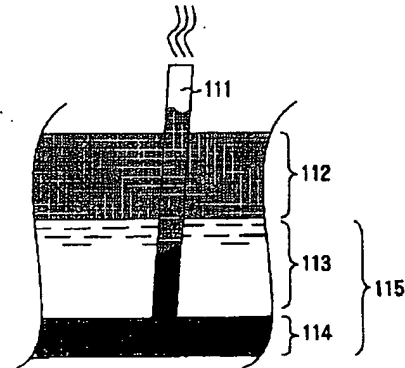
【図9】
【実施例4 / グルコース添加】



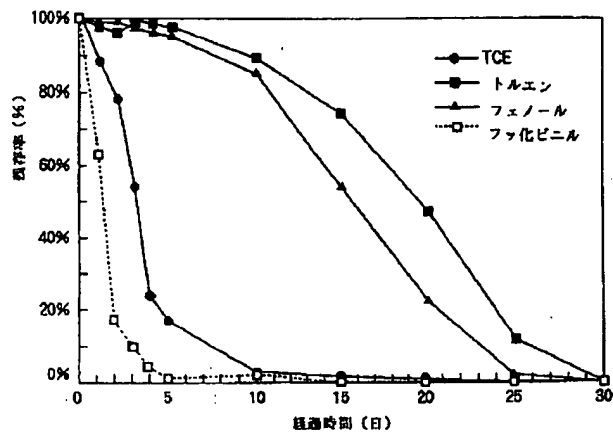
【図10】
【実施例7】



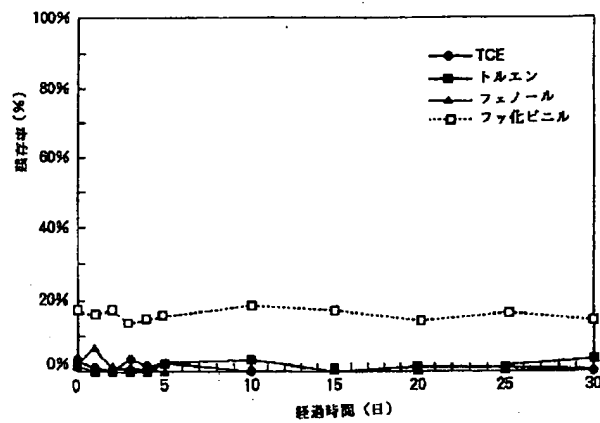
【図11】



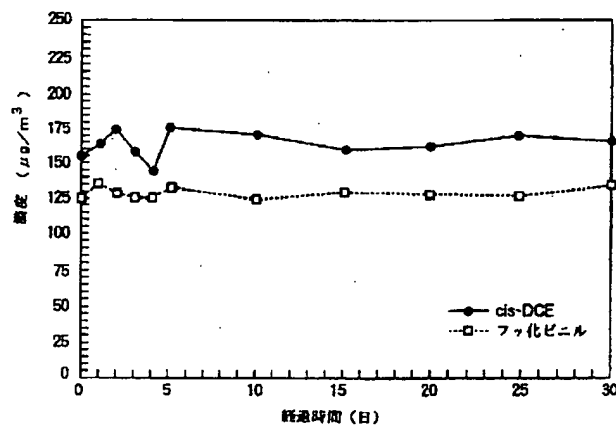
【図12】
【実施例8】



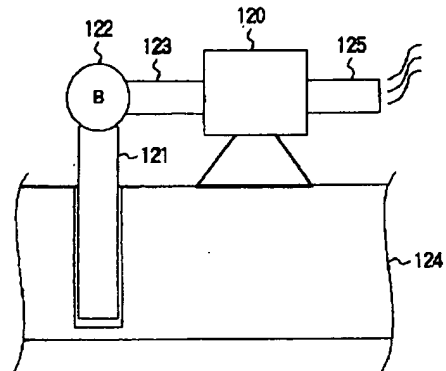
【図14】
【実施例9】



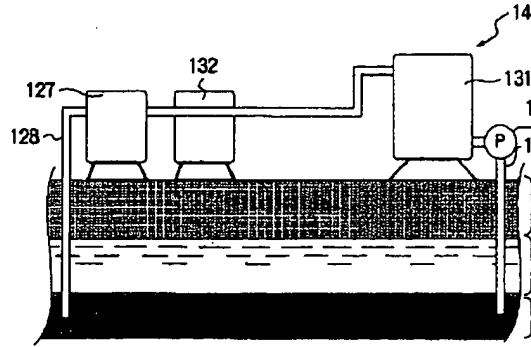
【図16】
【実施例10】



【図15】

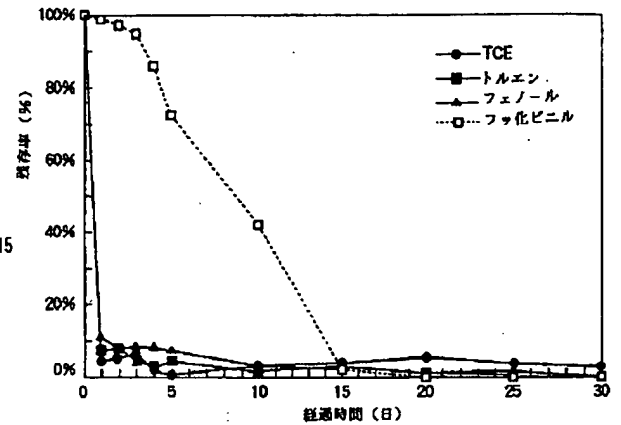


【図17】

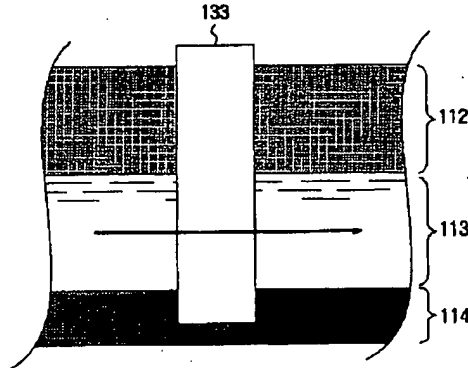


【図18】

【実施例11】

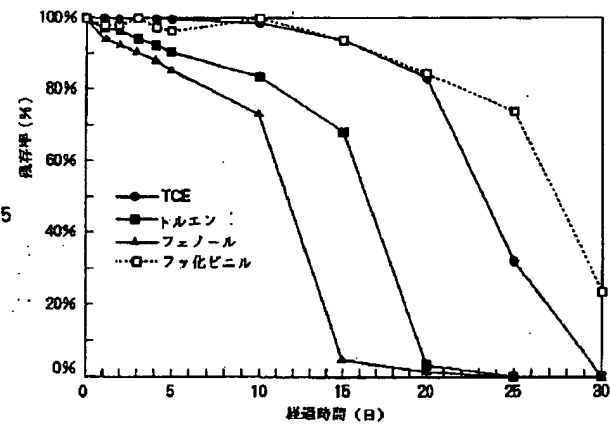


【図19】

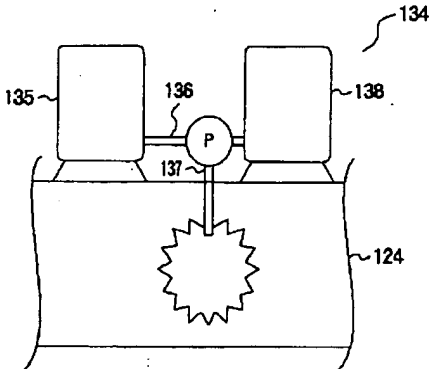


【図20】

【実施例12】

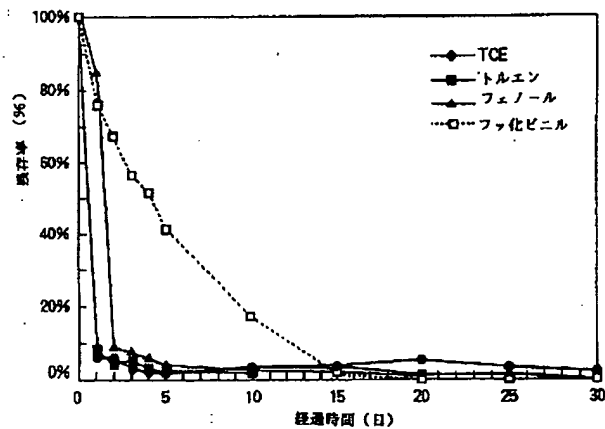


【図21】



【図22】

【実施例13】



【書誌的事項の続き】

【名称】 有機化合物の分解方法、有機化合物の分解装置、微生物の単離方法および新規微生物

【IPC6】 B09C 1/10 ZAB:C02F 3/34:C12N 1/20; //(C12N 1/20:C12R 1:01)

【FI】 B09B 3/00 ZAB:C02F 3/34:C12N 1/20;

【識別番号または出願人コード】 000003078

【出願/権利者名】 株式会社東芝

【発明／考案者名】	神奈川県川崎市幸区堀川町 7 2 番地	
	池田 理夫	
【発明／考案者名】	神奈川県川崎市幸区小向東芝町 1 番地	株式会社東芝研究開発センター内
	今村 裕子	
【発明／考案者名】	神奈川県川崎市幸区小向東芝町 1 番地	株式会社東芝研究開発センター内
	五反田 武志	
【発明／考案者名】	神奈川県横浜市磯子区新杉田町 8 番地	株式会社東芝横浜事業所内
	平川 千香子	
【発明／考案者名】	神奈川県川崎市幸区小向東芝町 1 番地	株式会社東芝研究開発センター内
	須山 佐一	
【代理人】	須山 佐一	
【優先権主張番号】	PH7-301200	平成 7 年(1995)11 月 20 日
【優先権主張国】	日本 (J P)	
【出願形態】	OL	

注) 本抄録の書誌的事項は初期登録時のデータで作成されています。